

小儿清瘟解热颗粒的抗菌及调节免疫药效

陈熹^{1,2}, 杨庆², 李琦², 陈颖², 阚晓溪², 黄鹤飞², 李玉洁², 王娅杰²,
蔡维艳², 翁小刚², 刘思思², 郭姗姗², 朱晓新^{2*}, 关晶^{3*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 首都儿科研究所, 北京 100020)

[摘要] **目的:**研究小儿清瘟解热颗粒对小鼠免疫功能的影响及体内、外抗菌作用。**方法:**取 Balb/C 小鼠 70 只,将小鼠按体重分为正常组、模型组、玉屏风颗粒组(2.8 g·kg⁻¹),胸腺肽组(9.2 mg·kg⁻¹),小儿清瘟解热颗粒低、中、高剂量组(10.92, 21.84, 43.68 g·kg⁻¹),每组 10 只,除正常组外,其余各组通过小鼠 ip 环磷酰胺构建免疫缺陷小鼠模型,观察小儿清瘟解热颗粒对 T、B 淋巴细胞增殖的影响及对碳廓清能力,血清、脾细胞溶血素含量的影响;取 ICR 小鼠只,按体重等级随机分为 7 组,分别为模型组,阿莫西林组(370 mg·kg⁻¹),小儿感冒宁合剂组(8.25 mL·kg⁻¹),小儿清瘟解热颗粒低、中、高剂量组(3.2, 6.4, 12.8 g·kg⁻¹),每组 20~22 只,采用小鼠腹腔注射金黄色葡萄球菌构建体内细菌感染模型,观察动物死亡数、死亡率,药物的保护率,动物的平均存活天数及生命延长率;在体外采用试管法观察药物对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、白色葡萄球菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌、乙性溶血性链菌、白色念珠菌、淋球菌及变形杆菌的最低抑菌浓度(MIC)。**结果:**小儿清瘟解热颗粒低、中剂量均可显著提高脂多糖(LPS),刀豆球蛋白 A(ConA)诱导的淋巴细胞增殖;对于金黄色葡萄球菌体内感染模型,小儿清瘟解热颗粒可使动物死亡率明显降低,动物存活天数明显延长(与模型组比较 $P < 0.05$, $P < 0.01$);同时,小儿清瘟解热颗粒体外对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、白色葡萄球菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌、乙性溶血性链菌、白色念珠菌及变形杆菌生长均有不同程度的抑制作用。**结论:**小儿清瘟解热颗粒对免疫低下小鼠的免疫功能具有一定的提高作用,在体内对金黄色葡萄球菌感染致小鼠死亡具有明显的保护作用,在体外对多种细菌的生长具有不同程度的抑制作用。

[关键词] 小儿清瘟解热颗粒; 免疫调节; 天然免疫; 获得性免疫; 抗菌

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0122-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220122

Antibacterial and Immune Regulating Efficacies of Xiaoe Qingwen Jiere Granules CHEN Xi^{1,2}, YANG Qing², LI Qi², CHEN Ying², KAN Xiao-xi², HUANG He-fei², LI Yu-jie², WANG Ya-jie², CAI Wei-yan², WENG Xiao-gang², LIU Si-si², GUO Shan-shan², ZHU Xiao-xin^{2*}, GUAN Jing^{3*} (1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China; 3. Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Xiaoe Qingwen Jiere Granule in regulating immune function in mice, and its antibacterial efficacy *in vitro* or *in vivo*. **Method:** Totally 70 Balb/C mice were divided into following groups: normal, model, Yupingfeng granule, thymosin, and low, medium, high doses of Xiaoe Qingwen Jiere granules (10.92, 21.84, 43.68 g crude drug/kg) according to body weight, with 10 in each group. Immune deficiency model was constructed through intraperitoneal injection with cyclophosphamide in all groups except for the normal group, in order to observe the influence of Xiaoe Qingwen Jiere granule on the T or B lymphocyte proliferation, carbon clearance ability and serum and hemolysin content. ICR mice were randomly divided into seven groups by weight: model group, amoxicillin group (370 mg·kg⁻¹), Xiaoe Ganmaoning

[收稿日期] 20150828(006)

[基金项目] 北京市科学技术委员会“十病十药”研发项目(Z111102059011003)

[第一作者] 陈熹, 硕士, 中药药理学, Tel:15810335687, E-mail:19901011chenxi@sina.com

[通讯作者] *朱晓新, 博士生导师, 研究员, 从事中药药理学和药代动力学研究, Tel:010-64056154, E-mail:zhuxx59@163.com;

*关晶, 副主任药师, 研发中心主任, 从事药品及制剂研发, E-mail:guanjing1119@126.com

mixture group ($8.25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low, medium, high-dose Xiaoe Qingwen Jiere granules groups, with 20 to 22 mice in each group. Bacterial infection model was constructed through intraperitoneal injection with *Staphylococcus aureus* to observe the animal mortality rate, drug protection and the average survival days of animals. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* were observed by using the tube method Qingwen Jiere. **Result:** Low and medium doses of Xiaoer Qingwen Jiere granules can increase the lymphocyte proliferation induced by lipopolysaccharide (LPS) and Concanavalin (ConA) significantly. In the model induced by staphylococcus aureus, Xiaoer Qingwen Jiere granules can reduce the mortality significantly and prolong the survival time and inhibit *S. aureus* ($P < 0.05$, $P < 0.01$), *S. epidermidis*, *E. coli*, *C. albicans* to varying degrees. **Conclusion:** Xiaoer Qingwen Jiere granule can improve the immune function of immune compromised mice, protect the mice infected by staphylococcus aureus from death *in vivo*, and inhibit the growth of a variety of bacteria inordinately.

[**Key words**] Xiaoer Qingwen Jiere granules; immune regulation; innate immunity; specific immunity; antibacterium

免疫反应是人体防卫、抵御疾病入侵的第一道防线。在免疫反应的起始、调节和功能平衡的过程中,有着多种细胞、体液的参与^[1]。脾脏与胸腺是免疫系统最为重要的两个免疫器官。在免疫反应的起始、调节和功能平衡中发挥了重要的作用。巨噬细胞是天然免疫功能的最重要执行者,是连接天然免疫和获得性免疫的重要参与者,同时也是机体免疫平衡和内环境稳定的重要调节者^[2]。当机体受到有效的抗原刺激时,会迅速对相应抗原特异性免疫细胞,特别是淋巴细胞进行动员和活化^[3]。当机体内获得性免疫系统被有效激活后,除能够有效应对抗原刺激,出现增殖反应外,在体液免疫水平,还能够充分动员抗原特异性 B 细胞,进一步分化发育,产生大量的抗原特异性抗体,实现获得性免疫系统(体液免疫)对机体抗原的特异高效清除^[4-5]。

金黄色葡萄球菌是一类重要病原菌,归属于葡萄球菌属,是革兰阳性菌的代表,可引起许多严重感染,是造成人和动物感染的主要致病菌之一^[6-7]。

小儿清瘟解热颗粒功能主治为清瘟解热,止咳利咽。用于小儿外感风瘟引起的感冒发热、鼻塞、流涕、咳嗽、咽痛,小儿上呼吸道感染见上述证候者。本研究从药物对体内外细菌的抑制活性和对机体自身免疫系统活性调节两个角度,分别进行了小儿清瘟解热颗粒的药效学实验研究,以期为今后临床使用提供进一步实验依据。

1 材料

1.1 动物及菌株 SPF 级 ICR 小鼠,18 ~ 20 g,合格证号 SCXK(京)2012-0004; SPF 级 ICR 小鼠,(14 ± 1) g,合格证号 SCXK(京)2012-0001,分别购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心和

北京维通利华实验动物技术有限公司。Balb/C 小鼠,雄性,19 ~ 21 g,SPF 级,购自中国食品药品检定研究院,合格证号 SCXK(京)2009-0017。金黄色葡萄球菌(标准株,361),表皮葡萄球菌(标准株,108),白色葡萄球菌(26101),大肠埃希菌(标准株,13,178),绿脓杆菌(209,210,211),乙性溶血性链球菌(10),白色念珠菌(标准株,58534),变形杆菌(标准株,49531),淋球菌(标准株)。购自中国食品药品检定研究院菌种室和中国中医科学院中药研究所新药研发中心,由本实验室 -80 °C 冰箱保存。

1.2 药物及试剂 小儿清瘟解热颗粒(北京首儿药厂,批号 20140704),胸腺肽肠溶片(黑龙江迪龙制药有限公司,批号 4201308023),玉屏风颗粒(广东环球制药有限公司,批号 20131204),小儿感冒颗粒(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号 14110938),小儿感冒宁合剂(江西盛翔制药有限公司,批号 140203),阿莫西林胶囊(哈药集团制药总厂,批号 A1406029),印度墨水(北京索莱宝科技有限公司,批号 1224D021),PBS 缓冲液(10 ×,北京索莱宝科技有限公司,批号 20131017),RPMI Medium 1640 basic(1 ×,培养基,美国 Gibco 公司,批号 8114413),Alsever 液(葡萄糖 2.05 g,柠檬酸钠 0.80 g,氯化钠 0.42 g,蒸馏水 100 mL,无菌过滤),营养肉汤培养基(中国食品药品检定研究院,批号 980226),乙醚(北京化工厂,批号 20120131)。

1.3 仪器 SpectraMax Plus384 型连续光谱扫描式读板仪(美国 Molecular Devices 公司),Thermo-371 型 CO₂ 培养箱(德国 Thermo 公司),HZQ-F160 型震荡培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),YP1002 型小鼠动物体重天平(上海越平科学仪器

有限公司), Item-AR1140 型电子分析天平(美国 Ohaus 公司)。

2 方法

2.1 对免疫低下小鼠免疫功能改善的影响 小鼠按体重分为 7 组,分别为正常组,模型组,中药阳性药玉屏风颗粒组($2.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),西药阳性药胸腺肽组($9.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),小儿清瘟解热颗粒低剂量($10.92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),中剂量($21.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),高剂量($43.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组(分别相当于临床等效剂量的 1.0, 2.0, 4.0 倍)。给药组以 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续口服给药 7 d,每日 1 次。模型组及正常组给予等体积蒸馏水。给药后第 4 天,腹腔注射环磷酰胺 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续注射 2 d,每天 1 次,构建免疫低下小鼠模型。给药第 7 天后开始进行实验。

2.1.1 巨噬细胞吞噬碳粒功能 末次给药 1 h 后,尾静脉注入 3 倍稀释的印度墨水^[8],注射后 1, 8 min,分别从眼静脉丛取血 $20 \mu\text{L}$,并立即将其加到 $2 \text{ mL} 0.1\% \text{ Na}_2\text{CO}_3$ 溶液中,混匀,用酶标仪在 600 nm 波长处检测吸光度 A ,计算廓清指数(K)及吞噬指数(α)。

2.1.2 刀豆蛋白 A(ConA)及脂多糖(LPS)诱导免疫低下小鼠脾淋巴细胞增殖 眼静脉丛取血,无菌取脾,将脾脏剪碎,以玻璃注射器芯研磨,200 目不锈钢筛过滤,混匀脾细胞悬液,以细胞计数器计数脾细胞量,并稀释成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。将脾细胞加入 96 孔板中,设对照孔,1 孔加 0.1 mL ConA ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),另 1 孔加 0.1 mL LPS ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)^[9]。37 °C 培养 5% CO_2 培养 72 h,培养结束前 4 h,吸去上清,加入 $25 \mu\text{L MTT}$ ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),培养结束后,每孔加入 0.5 mL 酸性异丙醇溶液,混匀,使用酶标仪在 570 nm 波长下检测 A 。计算淋巴细胞增殖能力。

$$A = \text{ConA/LPS 孔} - \text{不加 ConA/LPS 孔}$$

2.1.3 小儿清瘟解热颗粒对免疫低下小鼠脾细胞溶血素的影响 使用经典方法制备绵羊红细胞(SRBC)和豚鼠血清,备用。给药第 3 天后 ip 5% SRBC, $0.2 \text{ mL}/\text{只}$ 。眼静脉丛取血, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min 离心取血清,将血清按 1:100 倍稀释,取稀释血清 0.5 mL ,依次加入 5% SRBC 0.5 mL , 10% 补体 0.5 mL ,混匀,另设 PBS 对照管,37 °C 水浴 30 min,取出冰水终止反应。 $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min ,取上清,使用酶标仪在 540 nm 波长测定 A 。计算公式^[10]

$$\text{HC}_{50} = \text{样本 } A/\text{SRBC 半数溶血值} \times \text{稀释倍数}$$

2.2 小儿清瘟解热颗粒对金黄色葡萄球菌感染致

小鼠死亡的保护作用 感染菌液的制备:取金黄色葡萄球菌接种于营养肉汤培养液中,37 °C 培养 16 h。细菌比浊密度为 $9 \times 10^8/\text{mL}$ 。动物感染及分组:取 ICR 小鼠,按体重等级随机分为 7 组,分别为模型组、阿莫西林组、小儿感冒宁合剂组、小儿清瘟解热颗粒 3 个剂量组,每组 20 ~ 22 只,雌雄各半。分组后各给药组 ig 给药, $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,每天 1 次,连续 5 d,模型组在同等情况下给蒸馏水。第 3 天给药前 1 h 各组动物 ip 9×10^8 个/mL 的菌液, $0.2 \text{ mL}/\text{只}$ 进行造模。感染后每日观察动物的死亡情况,连续 14 d,记录死亡数,计算死亡率、保护率、平均存活天数及生命延长率。结果采用卡方检验及 t 检验进行统计学处理。

2.3 小儿清瘟解热颗粒的体外抑菌作用 用蒸馏水将小儿清瘟解热颗粒(清膏)配制成 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的原药液。采用金黄色葡萄球菌,表皮葡萄球菌,白色葡萄球菌,大肠埃希菌,绿脓杆菌,乙性溶血性链菌,白色念珠菌,淋球菌及变形杆菌。试验前各菌液取 $20 \mu\text{L}$,分别接种于装有 2 mL 肉汤培养基的试管中,置 37 °C 培养箱中培养 18 h。用麦氏比浊管调整至 $3 \times 10^8/\text{mL}$,再分步将菌液稀释至 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 。试验时采用终密度为 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 。试验时用营养肉汤培养基将各药物做 1:2 ~ 1:256 倍倍比稀释后,加至 96 孔细胞培养板中,每孔 $150 \mu\text{L}$ 。再加入 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的各种菌液 $15 \mu\text{L}$,同时设细菌对照组和阳性药对照组。置 37 °C 温箱中培养 24 h 后观察各孔中细菌生长情况,确定无细菌生长的最低药物浓度(MIC)。

3 结果

3.1 对免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬碳粒功能的影响 与模型组比较,小儿清瘟解热颗粒 $10.92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 使 K 有升高趋势,小儿清瘟解热颗粒 $10.92 \sim 43.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 使 α 均有升高趋势,但无统计学差异。玉屏风颗粒能明显升高吞噬指数($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对 ConA 及 LPS 诱导免疫低下小鼠脾淋巴细胞增殖影响 与模型组比较,小儿清瘟解热颗粒各剂量组连续给药 7 d,均可显著提高 LPS 诱导的淋巴细胞增殖反应($P < 0.05, P < 0.01$),小儿清瘟解热颗粒 $10.92, 21.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组可显著提高 ConA 诱导的淋巴细胞增殖能力($P < 0.05$)。玉屏风颗粒 $7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组可显著提高 ConA 及 LPS 诱导的淋巴细胞增殖能力($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 1 小儿清瘟解热颗粒对免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬碳粒功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Xiaoer Qingwen Jiere granules on carbon function of phagocyte in immunocompromised mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体重 /g	K	α
正常	-	25.96 ± 2.94	0.078 ± 0.012 ¹⁾	7.38 ± 0.59
模型	-	23.79 ± 2.09	0.063 ± 0.020	6.78 ± 0.94
小儿清瘟 解热颗粒	10.92	22.62 ± 2.76	0.073 ± 0.020	7.13 ± 1.08
	21.84	23.35 ± 1.84	0.070 ± 0.020	7.06 ± 1.63
	43.68	22.47 ± 2.90	0.069 ± 0.018	7.53 ± 0.97
胸腺肽	0.009 2	21.99 ± 1.88	0.063 ± 0.018	7.49 ± 0.93
玉屏风颗粒	2.8	21.97 ± 1.97	0.078 ± 0.016	8.05 ± 0.99 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 小儿清瘟解热颗粒对免疫低下小鼠淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Xiaoer Qingwen Jiere granules on lymphocyte proliferation in immunocompromised mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	LPS /μg·L ⁻¹	Con A /mg·L ⁻¹
正常	-	0.06 ± 0.06 ¹⁾	0.08 ± 0.05
模型	-	0.01 ± 0.07	0.04 ± 0.06
小儿清瘟解热颗粒	10.92	0.20 ± 0.09 ²⁾	0.10 ± 0.04 ¹⁾
	21.84	0.18 ± 0.14 ²⁾	0.12 ± 0.09 ¹⁾
	43.68	0.14 ± 0.14 ¹⁾	0.07 ± 0.10
胸腺肽	31.2	0.08 ± 0.17	0.03 ± 0.11
玉屏风颗粒	7.8	0.18 ± 0.13 ²⁾	0.12 ± 0.07 ¹⁾

3.3 对免疫低下小鼠脾细胞溶血素的影响 与模

表 4 小儿清瘟解热颗粒提取物对金黄色葡萄球菌致小鼠死亡的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Protective effect of Xiaoer Qingwen Jiere granules extract on *Staphylococcus aureus* bacteria cause death in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	死亡数/只	死亡率/%	保护率/%	平均存活时间/d	生命延长率/%
模型	-	20	17	85.00	-	1.9 ± 2.2	-
小儿清瘟解热颗粒	12.8	21	13	59.09	30.48	4.4 ± 2.4 ²⁾	129.7
	6.4	22	11	50.00	41.18 ¹⁾	4.7 ± 2.5 ²⁾	148.8
	3.2	22	12	54.55	35.82	4.4 ± 2.6 ²⁾	132.1
阿莫西林	0.37	22	2	9.09	89.31 ²⁾	6.5 ± 1.6 ²⁾	242.1
小儿感冒宁 ³⁾	8.25	22	14	63.64	25.13	4.2 ± 2.5 ²⁾	120.1

注:³⁾ 给药单位为 mL·kg⁻¹。

3.5 小儿清瘟解热颗粒的体外抑菌作用 经 24 h 培养后,细菌对照管均有细菌生长。小儿清瘟解热颗粒对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、白色葡萄球

型组比较,免疫低下模型组 HC₅₀ 显著低于正常组 ($P < 0.01$)。小儿清瘟解热颗粒 3 个剂量组 HC₅₀ 高于模型组,但无统计学差异。胸腺肽组对免疫低下小鼠血清 HC₅₀ 明显升高 ($P < 0.01$)。免疫低下模型组脾细胞溶血素 A 值显著低于正常组 ($P < 0.01$)。小儿清瘟解热颗粒 3 个剂量组对脾细胞溶血素 A 值均无明显影响。见表 3。

表 3 小儿清瘟解热颗粒对免疫低下小鼠血清溶血素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Xiaoer Qingwen Jiere granules on serum hemolysin in immunocompromised mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	A	HC ₅₀
正常	-	0.95 ± 0.04	1 843.46 ± 65.21 ²⁾
模型	-	0.40 ± 0.11	177.64 ± 49.07
小儿清瘟解热颗粒	10.92	0.39 ± 0.20	260.42 ± 182.71
	21.84	0.32 ± 0.07	228.78 ± 85.67
	43.68	0.31 ± 0.08	257.70 ± 154.53
胸腺肽	31.2	0.35 ± 0.07	283.87 ± 115.69 ¹⁾
玉屏风颗粒	7.8	0.39 ± 0.08	171.41 ± 14.15

3.4 对金黄色葡萄球菌感染致小鼠死亡的保护作用 采用金黄色葡萄球菌感染正常小鼠 2 周内,模型组动物死亡率为 85%,感染当天给予小儿清瘟解热颗粒,连续 5 d,3 个剂量组动物死亡率均明显降低,死亡率分别为 59.09%,50%,54.55%,死亡保护率分别为 30.48%,41.18%,35.82%,其中 10.92 g 生药/kg 组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$)。且 5.46,10.92 g·kg⁻¹ 组动物存活天数延长,与模型组比较有显著差异 ($P < 0.01$)。见表 4。

菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌、乙性溶血性链菌、白色念珠菌及变形杆菌生长均有不同程度的抑制作用。对大肠埃希菌、淋球菌生长无抑制作用。见表 5。

表 5 小儿清瘟解热颗粒的体外抑菌试验

Table 5 antibacterial experiment of *in vitro* Xiaoer Qingwen Jiere granules

菌种名称	菌号	小儿清瘟解热颗粒		小儿感冒宁合剂		阿莫西林 /g·L ⁻¹	细菌对照
		MIC/g·L ⁻¹	稀释度	MIC/g·L ⁻¹	稀释度		
乙型链球菌	10	12.5	1:4	0.25	1:4	-	+
变形杆菌	标准	12.5	1:4	0.25	1:4	-	+
白色念珠菌	58534	12.5	1:4	0.25	1:4	-	+
白色葡萄球菌	26101	6.25	1:8	0.5	1:2	-	+
大肠埃希菌	13	25	1:2	0.5	1:2	-	+
	178	25	1:2	0.5	1:2	-	+
	标准	+	1:2	0.5	1:2	-	+
绿脓杆菌	209	25	1:2	+	1:2	-	+
	210	25	1:2	0.5	1:2	-	+
	211	25	1:2	+	1:2	-	+
淋球菌	标准	+	1:2	+	1:2	-	+
表皮葡萄球菌	标准	25	1:2	0.5	1:2	-	+
	108	25	1:2	0.5	1:2	-	+
金黄色葡萄球菌	标准	12.5	1:4	0.5	1:2	-	+
	361	25	1:2	0.5	1:2	-	+

注：“-”表示无细菌生长，“+”表示有细菌生长。

4 讨论

小儿清瘟解热颗粒对免疫低下小鼠的免疫功能具有一定的改善作用,在碳廓清实验和溶血素实验中,各给药组具有一定的作用趋势。对免疫低下小鼠 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的增殖有显著诱导作用,初步证明了小儿清瘟解热颗粒对机体固有免疫功能具有一定的调节功能。

采用金黄色葡萄球菌感染正常小鼠,感染当天给予小儿清瘟解热颗粒,10.92 g·kg⁻¹ 剂量组动物死亡率明显降低。且 5.46,10.92 g·kg⁻¹ 剂量组动物存活天数延长。体外对金黄色葡萄球菌(标准株,361),表皮葡萄球菌(标准株,108),白色葡萄球菌(26101),大肠埃希菌(13,178),绿脓杆菌(209,210,211),乙性溶血性链菌(10),白色念珠菌(标准株,58534)及变形杆菌(标准株,49531)生长均有不同程度的抑制作用;对大肠埃希菌(标准株)、淋球菌(标准株)生长无抑制作用。

在大部分感染性疾病中,药物作用大多从 2 个途径产生药效,一方面是通过外源性对于细菌的直接杀伤作用产生药效,另一方面,是通过内源性的调节患者自身的免疫调节水平,诱导对病原体的杀伤^[11]。本实验通过内、外源 2 个方向,直接抑制和主动调节 2 个角度,对药物的相关疾病模型进行考量。

首先,从免疫调节角度而言,机体的免疫活性可以具体体现为固有免疫和特异性免疫 2 个部分^[12]。固有免疫系统也称为非特异性免疫,反应出现快,相对稳定且参与的免疫细胞较多,如中性粒细胞,巨噬细胞、NK 细胞等^[13]。巨噬细胞是机体固有免疫过程中的重要参与者,从中医理论水平而言,巨噬细胞功能稳定是“正气”的重要生理学基础。其在限制病原体迅速入侵,体内抗原清除吞噬、抗原递呈等多方面均发挥着不可替代的作用;同时,以巨噬细胞为药物作用靶点,能够有效且迅速的对宿主免疫功能,特别是天然免疫活性造成干预^[2]。淋巴细胞是白细胞的一种,淋巴细胞进行动员和活化是维持机体获得性免疫,特别是细胞免疫反应稳定、平衡,保证获得性免疫功能有效执行的重要分子机制。同时也是中医药理论中,“扶正固本”的现代医学阐释^[3]。而获得性免疫系统(体液免疫)对机体抗原的特异高效清除,也是中医理论“扶正固本”的重要体现。因此,以巨噬细胞的功能、淋巴细胞增殖强度、特异性抗体产生数量和活性为指标进行药效鉴定,能够较完整的反映出药物对天然免疫系统的影响^[14]。

第二,在抑制细菌活性方面,检测了最低抑菌浓度(MIC),它是测量抗菌药物的抗菌活性大小的一个指标,指在体外培养细菌 18~24 h 后能抑制培养

基内病原菌生长的最低药物浓度。药物 MIC 的测定对指导临床用药具有重要意义^[15]。抗菌中药的作用途径多种多样,少数是其有效成分直接作用于菌体,大多数抗菌机制是激发调动动物机体内在的抗菌积极因素,以及降低细菌毒力和减轻细菌对组织细胞的破坏作用等途径起到抗菌作用^[16]。

综上所述,一方面,小儿清瘟解热颗粒能够作用于内源性途径,调节机体免疫应答,进而改善免疫功能,另一方面,药物通过外源性途径,直接作用于致病菌,达到抗菌抑菌的目的。因此,小儿清瘟解热颗粒在药物作用过程中,具有抗菌和改善机体免疫力的潜在活性,能够为临床用药提供进一步提示。

[参考文献]

[1] 胡焯,许小青. 固有免疫识别与调控分子机制的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(4): 485-492.

[2] 熊平源,胡艺兰,郭凯文,等. 何首乌对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 数理医药学杂志, 2007, 20(3):370-371.

[3] 黄文荣,王立生,高春记,等. rhG-CSF 动员对供者 T 细胞增殖和细胞毒的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(5):995-998.

[4] 罗辉宇,罗爱林,蒋焕伟,等. 类风湿性关节炎特异性 B 淋巴细胞的分选与鉴定[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(4):467-469.

[5] 刘燕明. 天然免疫与获得性免疫的进化关系[J]. 免疫学杂志, 2001, 14(S1):20-23.

[6] 朱以军,李向阳. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药机制及检测[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(1):26-28.

[7] 高涛. 食品中金黄色葡萄球菌肠毒素及检测方法的研究进展[J]. 福建分析测试, 2003, 12(2): 1775-1778.

[8] 萧闵,杨阳,刘洋洋. 番茄红素与枸杞协同增强小鼠免疫力的实验研究[J]. 湖北中医杂志, 2010, 32(7):8-9.

[9] 绳娟,洪铁. 11 种中药对小鼠淋巴细胞活性及腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2):390-392.

[10] 詹林盛,王颖丽. 海带多糖的免疫调节作用[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(3):116-118.

[11] 李华茵,何礼贤,胡必杰,等. 呼吸机相关肺炎内源性感染途径的分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(2):121-125.

[12] 闻玉梅. 天然免疫与中西医结合[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1):1-2.

[13] 郭峰. 现代系统免疫学的形成与发展[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(1):88-91.

[14] 焦李成,杜海峰. 人工免疫系统进展与展望[J]. 电子学报, 2003, 31(10):1540-1548.

[15] Andrews J M. Determination of minimum inhibitory concentrations[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(6):1049-1049.

[16] 闫小娟,张静玲,杨敬芳,等. 6 种抗菌中药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用[J]. 中国热带医学, 2009, 9(2):219-220.

[责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①<http://www.syfjzz.com> 为本刊唯一域名,其他域名均非本刊。

②本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③投稿成功后,为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。